

10/069961

JC1 Rec'd PCT/PTG 08 MAR 2002

DOCKET NO.: 220572US0XPCT

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Michele MOCK

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR00/02494

INTERNATIONAL FILING DATE: September 8, 2000

FOR: ACELLULAR IMMUNOGENIC COMPOSITIONS AND ACELLULAR VACCINE  
COMPOSITIONS AGAINST BACILLUS ANTHRACIS

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119  
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

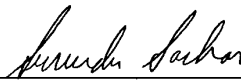
Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that  
the applicant claims as priority:

| <b><u>COUNTRY</u></b> | <b><u>APPLICATION NO</u></b> | <b><u>DAY/MONTH/YEAR</u></b> |
|-----------------------|------------------------------|------------------------------|
| France                | 99 11384                     | 10 September 1999            |

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the  
International Bureau in PCT Application No. PCT/FR00/02494.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423



22850

(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 1/97)

1. The first step in the process is to identify the problem or issue that needs to be addressed. This involves gathering information and understanding the context of the problem.



10/069961 #2

REC'D 24 OCT 2000

WIPO PCT

# BREVET D'INVENTION

PCT FR 00/02494

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 03 OCT. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

### DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA REGLE  
17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30





# BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

N° 55-1328

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir en lettres capitales

DB 540a W/170299

| <b>DATE DE REMISE DES PIÈCES</b> 10 SEPT 1999<br><b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b> 9911384<br><b>DÉPARTEMENT DE DÉPÔT</b> 75 INPI PARIS B<br><b>DATE DE DÉPÔT</b> 10 Sept 1999  |        | <b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b><br><br>CABINET ORES<br>6 Avenue de Messine<br>75008 PARIS<br><br><b>n° du pouvoir permanent</b> références du correspondant CMGrmF226/80FR <b>date</b> <b>téléphone</b> |                      |                |        |               |                      |  |  |  |  |
|---|--------|--|----------------------|----------------|--------|---------------|----------------------|--|--|--|--|
| <b>2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle</b><br><input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire<br><input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen<br><div style="text-align: center;">demande initiale<br/>↓<br/><input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n°</div> |        |  |                      |                |        |               |                      |  |  |  |  |
| <b>Établissement du rapport de recherche</b> <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat<br>Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non   |        |  |                      |                |        |               |                      |  |  |  |  |
| <b>Titre de l'invention</b> (200 caractères maximum)<br><br>COMPOSITIONS ACELLULAIRES IMMUNOGENES ET COMPOSITIONS ACELLULAIRES VACCINALES CONTRE BACILLUS ANTHRACIS   |        |  |                      |                |        |               |                      |  |  |  |  |
| <b>3 DEMANDEUR (S)</b> n° SIREN . . . . . code APE-NAF . . . . .<br>Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination<br><br>INSTITUT PASTEUR  |        | <b>Forme juridique</b><br><br>Etablissement Public   |                      |                |        |               |                      |  |  |  |  |
| <b>Nationalité (s)</b><br><br>Adresse (s) complète (s)<br><br>28 rue du Docteur Roux<br>75724 PARIS CEDEX 15  |        | <b>Pays</b><br><br>FRANCE  |                      |                |        |               |                      |  |  |  |  |
| <b>4 INVENTEUR (S)</b> Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée<br>En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/>   |        |  |                      |                |        |               |                      |  |  |  |  |
| <b>5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b> <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission  |        |  |                      |                |        |               |                      |  |  |  |  |
| <b>6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE</b><br><table border="1" style="width: 100%;"><thead><tr><th>pays d'origine</th><th>numéro</th><th>date de dépôt</th><th>nature de la demande</th></tr></thead><tbody><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></tbody></table>  |        |  |                      | pays d'origine | numéro | date de dépôt | nature de la demande |  |  |  |  |
| pays d'origine  | numéro | date de dépôt  | nature de la demande |                |        |               |                      |  |  |  |  |
|   |        |  |                      |                |        |               |                      |  |  |  |  |
| <b>7 DIVISIONS</b> antérieures à la présente demande n° . . . . . date . . . . . n° . . . . . date . . . . .  |        |  |                      |                |        |               |                      |  |  |  |  |
| <b>8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b><br>(nom et qualité du signataire)<br><br>Béatrice ORES (n° 92-4046)  |        | <b>SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION</b><br><br><b>SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI</b><br><br>   |                      |                |        |               |                      |  |  |  |  |

La loi n°776-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

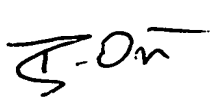
DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.. / 1..  
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

|  |                      |   |       |
|--|----------------------|---|-------|
| <b>Vos références pour ce dossier</b><br>(facultatif)  |                      | BLOjpp226/80FR  |       |
| <b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>  |                      | 9911384   |       |
| <b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)<br>COMPOSITIONS ACELLULAIRES IMMUNOGENES ET COMPOSITIONS ACELLULAIRES VACCINALES CONTRE BACILLUS ANTHRACIS   |                      |   |       |
| <b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b><br>INSTITUT PASTEUR  |                      |   |       |
| <b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages). |                      |   |       |
| Nom  |                      | MOCK  |       |
| Prénoms  |                      | Michèle   |       |
| Adresse  | Rue                  | 40 Boulevard de Reuilly   |       |
|  | Code postal et ville | 75012   | PARIS |
| Société d'appartenance (facultatif)  |                      |   |       |
| Nom  |                      |   |       |
| Prénoms  |                      |   |       |
| Adresse  | Rue                  |   |       |
|  | Code postal et ville |   |       |
| Société d'appartenance (facultatif)  |                      |   |       |
| Nom  |                      |   |       |
| Prénoms  |                      |   |       |
| Adresse  | Rue                  |   |       |
|  | Code postal et ville |   |       |
| Société d'appartenance (facultatif)  |                      |   |       |
| Nom  |                      |   |       |
| Prénoms  |                      |   |       |
| Adresse  | Rue                  |   |       |
|  | Code postal et ville |   |       |
| Société d'appartenance (facultatif)  |                      |   |       |
| <b>DATE ET SIGNATURE(S)</b><br><b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b><br><b>OU DU MANDATAIRE</b><br>(Nom et qualité du signataire)<br>Le 10 avril 2000<br><br>Béatrice ORES<br>n° 92-4046  |                      |  |       |

La présente invention concerne des compositions acellulaires immunogènes, des compositions acellulaires vaccinales contre *Bacillus anthracis*, et leurs applications en médecine humaine et en médecine vétérinaire.

*Bacillus anthracis* (*B. anthracis*), agent responsable de l'anthrax ou charbon est une bactérie Gram-positive, aérobie et formant des spores.

Cet agent induit une infection soit par inoculation intradermique, soit par ingestion ou inhalation des spores (Klein F. *et al.*, (1966), *J. Infect. Dis.*, 116, 1213-138 ; Friedlander A.M. *et al.*, (1993), *J. Infect. Dis.*, 167, 1239-1242), dont la transformation en cellules végétatives, formes encapsulées et toxinogènes, permet à la bactérie de proliférer et de synthétiser ses facteurs de virulence.

Les Inventeurs ont récemment montré dans un modèle murin d'une infection pulmonaire par *B. anthracis*, que les macrophages alvéolaires sont le site primaire de la germination, qui est rapidement suivie par l'expression des gènes des toxines, confirmant que la rencontre de la spore avec l'hôte est cruciale pour la pathogénicité de *B. anthracis* (Guidi-Rontani E ; *et al.*, *Molecular Biology*, (1999), 31, 9-17).

Les principaux facteurs de virulence sont :

- la capsule anti-phagocytaire constituée d'acide poly- $\gamma$ -D-glutamique (Avakyan A. A. *et al.* (1965), *J. of Bacteriology*, 90, 1082-1095) et
- trois facteurs protéiques agissant en combinaison par deux. La toxine oedématogène (PA-EF) induit un oedème après une injection sous-cutanée alors que la toxine létale (PA-LF) est responsable de la mort des animaux après injection intraveineuse (J. W. Ezzell *et al.*, (1984), *Infect. Immun.*, 45, 761-767. Le facteur présent dans les deux combinaisons est l'antigène protecteur (PA) qui intervient dans la fixation des toxines sur les cellules cibles. Les deux autres facteurs, le facteur oedématogène (EF) et le facteur létal (LF) sont responsables de la manifestation de l'effet toxique.

La production simultanée de la capsule et des toxines est indispensable pour la manifestation du pouvoir pathogène.

Alors que les gènes codant pour les enzymes synthétisant la capsule sont portés par le plasmide pXO2 (Green B. D. *et al.*, (1985), *Infect. Immun.*, 49, 291-297 ; Uchida I. *et al.*, (1985), *J. Gen. Microbiol.*, 131, 363-367), les trois gènes *pag*, *cya*, et *lef*, codant respectivement pour les facteurs PA, EF et LF sont portés par le plasmide pXO1 qui a été décrit par Mikesell P. *et al.* (*Infect. Immun.*, (1983), 39, 371-376).

Alors que de nombreux travaux ont montré que PA est le principal antigène responsable de la protection dans le cadre d'une immunisation naturelle ou

acquise par vaccination, les Inventeurs ont montré que LF est également un immunogène puissant (Mock M. *Annales de l'Institut Pasteur* décembre 1990).

Afin de clarifier le rôle des composants des toxines dans la toxicité de *B. anthracis*, les Inventeurs ont construit divers mutants. Ainsi, ils ont caractérisé  
 5 une souche dépourvue du plasmide pXO2 et dépourvue de PA par modification du plasmide pXO1. Du fait de l'absence de PA, cette souche ne présente plus de caractère létal (Cataldi A. *et al.* (1990), *Molecular Microbiology*, 4, 1111-1117).

Pour rechercher les éléments susceptibles d'intervenir dans l'immunisation contre l'infection par *B. anthracis*, les Inventeurs ont construit des  
 10 mutants, dépourvus d'au moins l'un des facteurs de toxicité responsable de la pathogénicité, c'est-à-dire déficient en PA, en EF ou en LF, voire dépourvus du plasmide pXO1 et dépourvus en plus du plasmide pXO2. Bien que dépourvus de toxicité ou présentant une toxicité atténuée, les mutants simples, notamment RP9 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur  
 15 sous le numéro I-1094 en date du 2 mai 1991) et RP10 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-1095 en date du 2 mai 1991), et le double mutant RP 42 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2271 en date du 28 juillet 1999), se sont révélés aptes à produire des anticorps immunoprotecteurs contre  
 20 une infection par une souche Sterne sauvage. Ces mutants sont décrits dans la demande Internationale n° 92/19720, et dans les articles de Pezard C. *et al.*, (*Infection and Immunity*, (1991), 59, 3472-3477 et *J. General Microbiology*, (1993), 139, 2459-2463).

Actuellement, le vaccin vétérinaire commercialisé (Merial®) est un  
 25 vaccin vivant composé d'une suspension de spores de la souche Sterne de *B. anthracis*. Ce vaccin n'est pas utilisable en médecine humaine et son efficacité chez l'animal varie selon les lots, sans que les causes de ces variations puissent être déterminées.

En médecine humaine, deux vaccins contre la maladie du charbon,  
 30 essentiellement développés en Angleterre et aux Etats-Unis sont utilisés. Il s'agit de vaccins acellulaires constitués principalement de l'antigène protecteur (PA), préparé à partir de surnageants de culture de la souche toxigène Sterne de *B. anthracis* et d'un adjuvant pouvant être utilisé en médecine humaine, l'hydroxyde d'alumine.

Des études récentes sur ces deux vaccins ont montré que le vaccin  
 35 anglais, contenant des traces de EF et de LF induisant une réponse anticorps en ELISA, était plus efficace sur le cobaye que le vaccin américain, apparemment dépourvu de ces deux composants (Turnbull P.C. *et al.* (1991), *Vaccine*, 9, 533-539).



Toutefois pour ces deux vaccins, le protocole de vaccination est contraignant car il nécessite six injections en dix-huit mois, suivies d'un rappel par an.

De plus ces deux vaccins actuellement disponibles possèdent des effets secondaires néfastes qui rendent leur utilisation limitée.

5                   Finalement, la protection induite par ces vaccins acellulaires chez  
---l'animal, envers un test d'épreuve avec une souche virulente, n'est jamais totale,  
                  contrairement à celle obtenue avec le vaccin vivant.

Compte tenu de l'importance des infections causées par *B. anthracis*, de nombreux travaux sont actuellement consacrés à l'amélioration du vaccin acellulaire qui devrait idéalement permettre la même protection que le vaccin vivant tout en étant dépourvu d'effets secondaires.

Dans ce cadre, les Inventeurs se sont donné pour but de pourvoir à un vaccin acellulaire fiable, efficace, dépourvu d'effets secondaires qui pallie les inconvénients des vaccins existants et dont les propriétés vaccinales soient faciles à contrôler.

La présente invention a en conséquence pour objet une composition immunogène acellulaire, apte à induire une réponse immunitaire contre les infections à *B. anthracis*, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- 20 - un antigène protecteur (PA),  
- des spores tuées et éventuellement purifiées, obtenues soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* portant une ou plusieurs mutations choisies parmi les mutations au niveau d'au moins un gène codant pour une protéine responsable d'un effet toxique chez *B. anthracis*, soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* dépourvues d'au moins un des plasmides pXO1 et pXO2,

25 associés au moins à un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite composition immunogène acellulaire est apte à produire des d'anticorps contre *B. anthracis*.

La présente invention a également pour objet une composition  
30 vaccinale acellulaire contre *B. anthracis*, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- un antigène protecteur (PA),
- des spores tuées et éventuellement purifiées, obtenues soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* portant une ou plusieurs mutations choisies parmi les mutations au niveau d'au moins un gène codant pour une protéine responsable d'un effet toxique chez *B. anthracis*, soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* dépourvues d'au moins un des plasmides pXO1 et pXO2,

associés au moins à un véhicule pharmaceutiquement acceptable et à au moins un adjuvant.

Les adjuvants utilisés sont des adjuvants classiquement utilisés et seront notamment, soit la saponine dans le cas du vaccin vétérinaire, soit  
5 avantageusement choisis dans le groupe constitué par l'hydroxyde d'alumine et le squalène, dans le cas du vaccin humain.

Dans le cadre de la présente invention, les spores peuvent être tuées par tout moyen physique ou chimique conduisant à leur inactivation. A titre d'exemple on peut citer le traitement au formaldéhyde ou l'irradiation.

10 Au sens de la présente invention, on entend par mutation une délétion, une modification ou une addition au niveau du gène concerné, qui résulte soit en un gène dépourvu de sa capacité à produire le facteur de virulence correspondant, (facteurs protéiques composants les toxines tels qu'ils ont été définis précédemment), soit apte à produire un facteur de virulence atténué.

15 Selon un mode de réalisation particulier de l'Invention, les compositions immunogènes et les compositions vaccinales peuvent comprendre en outre au moins une exotoxine détoxifiée choisie notamment dans le groupe constitué par le facteur létal (LF) et le facteur oedématogène (EF) détoxifiés.

Au sens de la présente invention, on entend par exotoxine détoxifiée,  
20 une protéine qui entre dans la composition d'une toxine et est nécessaire à la manifestation de l'effet toxique de *B. anthracis*, notamment de l'oedème ou de la toxicité létale, même si cet effet résulte de la combinaison de l'activité de plusieurs facteurs, et qui est produite par un gène dont le site actif a subi une mutation.

Les compositions immunogènes et vaccinales selon l'Invention, sont  
25 basées sur les étapes-clés qui prennent en compte la spécificité de la maladie du charbon, à savoir :

- la protection envers les toxines,
- la germination de la spore et
- le développement consécutif de la bactérie elle-même.

30 Elles possèdent un fort pouvoir protecteur de l'ordre de 100 %, nettement supérieur à celui obtenu avec le PA seul ou les spores tuées seules, ce qui permet d'avoir une immunisation complète avec une seule injection dans les conditions du vaccin vétérinaire et deux injections dans les conditions du vaccin à usage humain.

35 Dans un autre mode de mise en oeuvre particulier des compositions immunogènes et vaccinales selon l'invention, les spores sont issues d'une souche de *B. anthracis* choisie dans le groupe constitué par les souches suivantes : Sterne 7702

(M. Sterne *J. Vet. Sci. Anima. Indust.*, (1939), 13, 315-317), RPLC2 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2270 en date du 28 juillet 1999), RP42 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2271 en date du 28  
5 juillet 1999).

Dans un autre mode de mise en oeuvre avantageux des compositions immunogènes et vaccinales selon l'invention, l'antigène protecteur est choisi dans le groupe constitué par les antigènes protecteurs purifiés issus de n'importe quelle souche Sterne sauvage ou mutée de *B. anthracis*, et les antigènes protecteurs  
10 recombinants, notamment celui produit par *B. subtilis*.

De manière avantageuse, l'antigène protecteur est issu de la souche RP42 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2271 en date du 28 juillet 1999).

La présente invention a également pour objet la souche RPLC2  
15 déposée auprès de la Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2270 en date du 28 juillet 1999.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'au moins un anticorps dirigé contre les spores issues de souches, obtenues soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* portant une ou plusieurs mutations choisies parmi  
20 les mutations au niveau d'au moins un gène codant pour une protéine responsable d'un effet toxique chez *B. anthracis*, soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* dépourvues d'au moins un des plasmides pXO1 et pXO2, pour la fabrication d'un médicament apte à induire une immunisation passive. En effet les antibiotiques sont le seul traitement actuel contre le charbon et doivent être administrés précocement, avant  
25 l'apparition du choc toxique. En conséquence une sérothérapie visant à la fois les toxines et la germination des spores serait un bon complément.

Les anticorps peuvent être des anticorps polyclonaux obtenus par immunisation d'un animal approprié avec les spores issues de souches utilisées pour la préparation des compositions selon l'invention, dans des conditions habituelles de  
30 préparation de tels anticorps.

Les anticorps peuvent être des anticorps monoclonaux obtenus de manière connue en soi, notamment par fusion des cellules spléniques de souris immunisées avec un antigène consistant en des spores issues de souches utilisées pour la préparation des compositions selon l'invention.

35 La présente invention a également pour objet des préparations antigéniques purifiées caractérisées en ce qu'elles sont issues de spores de *B. anthracis*, et comprennent par exemple un ou plusieurs des exoantigènes de poids

moléculaires respectifs 15 kDa, 30 kDa, 55 kDa, et supérieur à 200 kDa, lesdits poids moléculaires étant déterminés par l'utilisation de la trousse *AMERSHAM® LMW Electrophoresis Calibration Kit*.

Conformément à l'invention, ces compositions antigéniques sont  
5 obtenues par des techniques classiques connues de l'homme du métier.

La présente invention a de plus pour objet les anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre lesdites compositions antigéniques.

Les compositions immunogènes et vaccinales selon l'invention peuvent être administrées, seules ou en combinaison avec d'autres vaccins, par  
10 injection ou par toute voie habituellement utilisée pour la vaccination.

Les dose à administrer seront déterminées en fonction de l'animal ou de la personne que l'on cherche à protéger.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description et des exemples illustrés par les figures dans lesquelles :

15 - la figure 1 représente l'analyse par immunoblot des protéines de la spore selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 5,

- la figure 2 représente l'analyse par immunoblot des protéines de l'exosporium (A) révélation par un anticorps polyclonal et un anticorps monoclonal (35B8) (B) analyse selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 5,

20 - la figure 3 représente les différentes souches de *B. anthracis* utilisées pour préparer la souche RPLC2. La souche RPLC2 produit les composants des toxines inactivés par mutations ponctuelles dans les sites actifs des protéines LF (LF686 ; H686→A) et EF (EF346/353 ; K346→Q et K353→Q). Dans ce tableau, les nombres qui suivent  $\Delta$  indiquent les nucléotides auxquels les délétions commencent et

25 finissent ; Erm, Kan et Sps indiquent l'insertion de cassettes de résistance à l'érythromycine, à la kanamycine et à la spectinomycine ;  $\emptyset$  correspond à un organisme qui ne présente pas de résistance à ces antibiotiques.

### 30 Exemple 1 : Matériel et méthode pour la préparation des compositions selon l'invention

#### 1.1. Construction de la souche RPLC2

La souche RPLC2 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2270 en date du 28 juillet 1999) est construite à partir des souches indiquées dans la figure 3, selon les  
35 principes opératoires décrits par Pezard C. *et al.* (1993) (référence citée).

#### 1.2. Préparation du PA

La protéine PA est préparée à partir de la souche mutante de *B. anthracis* RP42 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2271 en date du 28 juillet 1999).

Les surnageants de culture en milieu R (Ristroph J. D. *et al.* (1983), *Infection and Immunity*, 39, 483-486) sont filtrés puis concentrés sur un système Minitan® (membrane Millipore® PLGC OMP).

L'antigène PA est ensuite purifié par chromatographie ultra-rapide (FPLC) sur colonne monoQ® selon le protocole décrit par Pezard C. *et al.* (1993) (référence citée).

### 10 1.3. Préparation et inactivation des spores

Les spores sont préparées à partir de la souche Sterne 7702 selon le mode opératoire décrit par Guidi-Rontani E *et al.* (1999) (référence citée).

Les spores sont préparées sur un milieu solide NBY, puis lavées à l'eau distillée. Elles sont inactivées par traitement au formol, à une concentration  
15 finale de 4 %, pendant 3 heures à 37 °C.

Après lavage par centrifugation, les spores sont reprises dans le volume initial de sérum physiologique (concentration finale de  $10^9$  spores/ml).

Cette suspension est utilisée pour réaliser l'immunisation.

Si nécessaire, notamment lorsque l'on veut préparer un vaccin à  
20 usage humain, les spores peuvent être purifiées avant le traitement au formol sur un gradient de Radioselectran® (Schering S.A.) de 50 % à 76 %.

### 1.4. Préparation des compositions vaccinales

Les compositions sont préparées soit à partir de spores tuées seules préparées selon le mode opératoire décrit en 1.3, soit à partir d'un mélange de PA (à  
25 une concentration telle qu'on injecte 10 µg par souris) et de spores tuées ( $10^8$  spores par souris), auxquels on ajoute comme adjuvant soit de l'hydroxyde d'alumine à une concentration finale de 0,3 %, soit de la saponine à une concentration finale de 0,05 %

### 1.5. Protocole de traitement des souris

On utilise des souris Swiss femelles de six semaines fournies par la  
30 Société Iffa-Credo (BP0102 - 69592 L'ARBRESLE-Cedex).

Les animaux sont répartis en groupe de six et nourris *ad libitum*.

Les injections sont faites par voie sous-cutanée au niveau de l'aîne sous un volume de 200 µl.

### 1.6. Mesure des taux d'anticorps

35 Les taux d'anticorps sont mesurés par un test ELISA classique.

**Exemple 2 : Effet de deux immunisations dans les conditions du vaccin acellulaire humain (protocole n° 1)**

**2.1. Traitement des animaux**

Le protocole d'injections pour chaque groupe est le suivant :

5 - deux injections de compositions vaccinales préparées comme indiqué au point 1.4. ou d'adjuvant (hydroxyde d'alumine) sont réalisées à 28 jours d'intervalles et

10 - une injection d'épreuve est réalisée au 43<sup>ième</sup> jour avec la souche virulente 17JB de *B. anthracis* (souche de référence Pasteur n° 2) fournie par la Société Rhône-Mérieux.

Quatre groupe d'animaux sont immunisés selon ce protocole comme suit :

15 - le premier groupe reçoit l'hydroxyde d'alumine seule,  
- le second groupe reçoit une dose de PA de 10 µg par souris,  
- le troisième groupe reçoit les spores seules à raison de 10<sup>8</sup> spores par souris et

- le quatrième groupe reçoit le mélange PA + spores tuées de manière à avoir 10 µg par souris et 10<sup>8</sup> spores par souris.

20 Tous les groupes reçoivent au 43<sup>ième</sup> jour, une dose d'épreuve correspondant à 30 fois la DL50, soit 1,5 x 10<sup>4</sup> spores par souris.

**2.2. Résultats**

Ils sont donnés dans le tableau 1 ci-dessous.

**TABLEAU 1**

25

| Traitement          | Nombre de morts au<br>43 <sup>ième</sup> jour | Pourcentage de survie<br>au 43 <sup>ième</sup> jour |
|---------------------|---|---|
| Adjuvant seul       | 6/6   | 0 %   |
| PA seul             | 3/6   | 50 %  |
| Spores tuées seules | 2/6   | 33 %  |
| PA + spores tuées   | 0/6   | 100 %   |

Ces résultats montrent clairement que seules les compositions vaccinales selon l'invention sont aptes à permettre une protection complète.

**Exemple 3 : Effet de deux immunisations dans les conditions du vaccin à usage humain (protocole n° 2)**

**3.1. Traitement des animaux**

Le protocole d'injections pour chaque groupe est le suivant :

- deux injections de compositions vaccinales préparées comme indiqué au point 1.4. ou d'adjuvant (hydroxyde d'alumine) sont réalisées à 21 jours d'intervalles et
- une injection d'épreuve est réalisée au 32<sup>ième</sup> jour avec la souche virulente 17JB de *B. anthracis* (souche de référence Pasteur n° 2) fournie par la Société Rhône-Mérieux.

Quatre groupe d'animaux sont immunisés selon ce protocole comme suit :

- le premier groupe reçoit l'hydroxyde d'alumine seule,
- le second groupe reçoit une dose de PA de 10 µg par souris,
- le troisième groupe reçoit les spores seules à raison de 10<sup>8</sup> spores par souris et
- le quatrième groupe reçoit le mélange PA + spores tuées de manière à avoir 10 µg par souris et 10<sup>8</sup> spores par souris.

Tous les groupes reçoivent, au 32<sup>ième</sup> jour, une dose d'épreuve correspondant à 100 fois la DL50, soit 1,5 x 10<sup>4</sup> spores par souris.

**3.2. Résultats**

**3.2.1. *Taux de survie***

Les résultats sont donnés dans le tableau 2 ci-dessous.

25

**TABLEAU 2**

| Traitement          | Nombre de morts au 32 <sup>ième</sup> jour | Pourcentage de survie au 32 <sup>ième</sup> jour |
|---------------------|--|--|
| Adjuvant seul       | 6/6  | 0 %  |
| PA seul             | 1/6  | 83 %   |
| Spores tuées seules | 1/7  | 85 %   |
| PA + spores tuées   | 0/6  | 100 %  |

Ces résultats montrent clairement que seules les compositions vaccinales selon l'invention sont aptes à permettre une protection complète.

### 3.2.2. Taux d'anticorps

Les taux d'anticorps dirigés contre les spores sont élevés, de l'ordre de 10 000 à 15 000, et identiques dans les deux groupes qui les ont reçues, que ces spores soient seules ou associées à PA.

5 Ces résultats confirment l'effet de synergie des compositions selon l'invention, qui, avec un taux d'anticorps identique à celui obtenu par injection des spores tuées seules, permettent une protection complète.

**Exemple 4: Comparaison de l'efficacité des compositions vaccinales selon l'invention avec le vaccin vivant Sterne dans les conditions du vaccin à usage vétérinaire (une seule injection en utilisant la saponine comme adjuvant)**

#### 4.1. Traitement des animaux

Le protocole d'injections pour chaque groupe est le suivant :

- une injection de compositions vaccinales préparées comme indiqué  
15 au point 1.4. ou de saponine est réalisée à J0 et  
- une injection d'épreuve est réalisée au 32<sup>ème</sup> jour avec la souche virulente 17JB de *B. anthracis* (souche de référence Pasteur n° 2) fournie par la Société Rhône-Mérieux.

Cinq groupe d'animaux sont immunisés selon ce protocole comme  
20 suit :

- le premier groupe reçoit la saponine seule,  
- le second groupe reçoit une dose de PA de 10 µg par souris,  
- le troisième groupe reçoit les spores seules à raison de 10<sup>8</sup> spores  
par souris,

25 - le quatrième groupe reçoit le mélange PA + spores tuées de manière à avoir 10 µg par souris et 10<sup>8</sup> spores par souris et  
- le cinquième groupe reçoit le vaccin vivant Sterne préparé à l'Institut Pasteur

Tous les groupes reçoivent une dose d'épreuve correspondant à 100  
30 fois la DL50, soit 10<sup>5</sup> spores au 32<sup>ème</sup> jour.

#### 4.2. Résultats

Ils sont donnés dans le tableau 3 ci-dessous.



TABLEAU 3

| Traitement          | Nombre de morts au<br>32 <sup>ième</sup> jour | Pourcentage de survie<br>au 32 <sup>ième</sup> jour |
|---------------------|---|---|
| Adjuvant seul       | 6/6   | 0 %   |
| PA seul             | 1/6   | 83 %  |
| Spores vivantes     | 0/6   | 100 %   |
| Spores tuées seules | 4/6   | 33 %  |
| PA + spores tuées   | 0/6   | 100 %   |

- 5 Ces résultats montrent clairement que les compositions vaccinales selon l'invention sont aussi efficaces que le vaccin vivant et pourraient par conséquent être avantageusement utilisées dans les conditions du vaccin vétérinaire.

#### Exemple 5: Analyse par immunoblot des protéines de spores de *B. anthracis*

##### 10 5.1. Matériel et méthode

##### 5.1.1. *Préparation des anticorps polyclonaux et monoclonaux.*

- Un sérum polyclonal de souris immunisées avec des spores tuées issues, par exemple, de la souche RPLC2 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2270 en date du 28  
15 juillet 1999) est préparé selon des techniques classiques et connues de l'homme du métier.

---

L'anticorps monoclonal spécifique de la surface de la spore (35B8) est préparé selon la technique décrite par Kohler *et al.*, (1975), *Nature*, 296, 495-497.

##### 5.1.2. *Extraction des spores*

- 20 Les protéines de la spore sont solubilisées par traitement des spores avec un tampon Tris-HCl à pH 9,8 contenant 8 M d'urée et 2 % de SDS ou avec un tampon Tris 10 mM à pH 9,5 contenant 10 mM d'EDTA et 1 % de SDS, selon la technique décrite par Garcia-Patrone, (1995), *Molecular and Cellular Biochem.*, 145, 29-37).

##### 25 5.2. Résultats

Ils sont illustrés à la figure 1 et à la figure 2.

Le sérum polyclonal de souris reconnaît 3 espèces protéiques de poids moléculaire respectifs 15 kDa, 30 kDa, 55 kDa et une espèce protéique de poids moléculaire supérieur à 200 kDa. (Figure 1).

L'espèce la plus lourde est également reconnue par l'anticorps monoclonal 35B8 et semble appartenir à l'exosporium (Figure 2A).

En effet l'analyse par immunoblot des protéines de l'exosporium, les différents anticorps monoclonaux utilisés, dont 35B8, reconnaissent une espèce  
5 protéique de poids moléculaire supérieur à 200 kDa (Figure 2A).

Il ressort de ce qui précède que les compositions vaccinales selon l'invention sont aptes à permettre une protection complète aussi bien dans les conditions du vaccin humain que du vaccin vétérinaire.

## REVENDEICATIONS

1. Composition immunogène acellulaire, apte à induire une réponse immunitaire contre les infections à *B. anthracis*, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- 5                   - un antigène protecteur (PA),
- des spores tuées et éventuellement purifiées, obtenues soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* portant une ou plusieurs mutations choisies parmi les mutations au niveau d'au moins un gène codant pour une protéine responsable d'un effet toxique chez *B. anthracis*, soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis*
- 10   dépourvues d'au moins un des plasmides pXO1 et pXO2, associés au moins à un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

2. Composition immunogène acellulaire selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est apte à produire des anticorps contre *B. anthracis*.

3. Composition vaccinale acellulaire contre *B. anthracis*,  
15 caractérisée en ce qu'elle comprend :

- un antigène protecteur (PA),
- des spores tuées et éventuellement purifiées, obtenues soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* portant une ou plusieurs mutations choisies parmi les mutations au niveau d'au moins un gène codant pour une protéine responsable
- 20   d'un effet toxique chez *B. anthracis*, soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* dépourvues d'au moins un des plasmides pXO1 et pXO2, associés au moins à un véhicule pharmaceutiquement acceptable et à au moins un adjuvant.

---

4. Composition immunogène selon l'une quelconque des  
25 revendications 1 et 2, ou composition vaccinale selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins une exotoxine détoxifiée choisie dans le groupe constitué par le facteur létal (LF) et le facteur oedématogène (EF) détoxifiés.

5. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, ou composition vaccinale selon la revendication 3, caractérisée  
30 en ce que les spores sont issues d'une souche de *B. anthracis* choisie dans le groupe constitué par les souches suivantes : Sterne 7702, RPLC2 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2270 en date du 28 juillet 1999) et RP42 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2271 en date du 28  
35 juillet 1999).

6. Composition immunogène ou composition vaccinale selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'antigène protecteur est

choisi dans le groupe constitué par les antigènes protecteurs purifiés issus de n'importe quelle souche Sterne sauvage ou mutée de *B. anthracis*, et les antigènes protecteurs recombinants.

5 7. Composition immunogène ou composition vaccinale selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'antigène protecteur est issu de la souche RP42 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2271 en date du 28 juillet 1999).

10 8. Souche RPLC2 déposée auprès de la Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2270 en date du 28 juillet 1999.

9. Utilisation d'au moins un anticorps dirigé contre les spores issues de souches obtenues, soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* portant une ou plusieurs mutations choisies parmi les mutations au niveau d'au moins un gène codant pour une protéine responsable d'un effet toxique chez *B. anthracis*, soit à partir de  
15 souches mutantes de *B. anthracis* dépourvues d'au moins un des plasmides pXO1 et pXO2, pour la fabrication d'un médicament apte à induire une immunisation passive.

10. Préparations antigéniques purifiées caractérisées en ce qu'elles sont issues de spores de *B. anthracis* et comprennent un ou plusieurs des exoantigènes de poids moléculaires respectifs 15 kDa, 30 kDa, 55 kDa, et supérieur à 200 kDa.

20 11. Anticorps dirigés contre les préparations antigéniques selon la revendication 10.

FIGURE 1

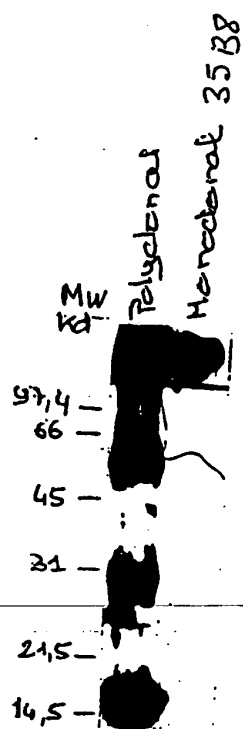


FIGURE 2

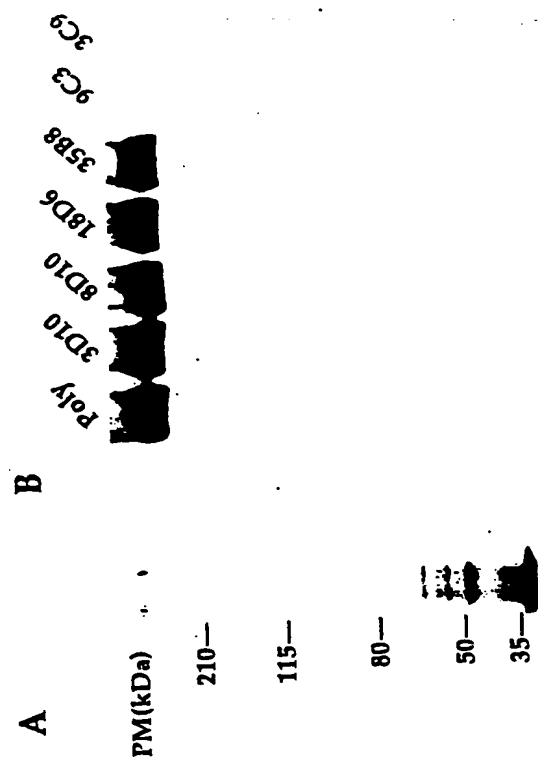


FIGURE 3

| Souche             | Génotype                                 | Résistance<br>à un antibiotique | Facteurs produits |       |           | Souche parentale                      |
|--------------------|--|---------------------------------|-------------------|-------|-----------|---------------------------------------|
|                    |  |                                 | PA                | LF    | EF        |                                       |
| 7702               | pXOI                                     | Ø                               |                   |       |           | Souche Sterne<br>(Collection Pasteur) |
| RPA                | pXOI- <i>mgA</i> Δ(1805-2871)            | Spc                             |                   | LF    | EF        | 7702                                  |
| RPA200             | pXOI- <i>mgA</i> Δ(1805-4105)            | Erm                             |                   | LF    | EF        | 7702                                  |
| RPL                | pXOI- <i>lef</i> Δ(2105-2970)            | Spc                             | PA                |       | EF        | 7702                                  |
| RPL200             | pXOI- <i>lef</i> Δ(405-2911)             | Erm                             | PA                |       | EF        | 7702                                  |
| RPE                | pXOI- <i>cyn</i> Δ(400-2311)             | Spc                             | PA                | LF    |           | 7702                                  |
| RPE346             | pXOI- <i>cyn</i> 346/353                 | Ø                               | PA                | LF    | EF346/353 | RPE                                   |
| RPL686             | pXOI- <i>lef</i> 686                     | Ø                               | PA                | LF686 | EF        | RPL                                   |
| RPL686Δ <i>cyn</i> | pXOI- <i>cyn</i> Δ(1414-2420)            | Kan                             | PA                | LF686 |           | RPL686                                |
| RPLC2              | pXOI- <i>lef</i> 686- <i>cyn</i> 346/353 | Ø                               | PA                | LF686 | EF346/353 | RPL686Δ <i>cyn</i>                    |
| RPA163             | pXOI- <i>mgA</i> Δ(2374-2394)            | Ø                               | PA163             | LF    | EF        | RPA                                   |
| RPA313             | pXOI- <i>mgA</i> Δ(2826-2933)            | Ø                               | PA313             | LF    | EF        | RPA                                   |
| RPA705             | pXOI- <i>mgA</i> Δ(4005-4053)            | Ø                               | PA705             | LF    | EF        | RPA200                                |
| RPA608             | pXOI- <i>mgA</i> 608                     | Ø                               | PA608             | LF    | EF        | RPA200                                |

